

VERSION CORRIGÉE

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
10 juillet 2003 (10.07.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2003/055994 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ : C12N 7/00,
C07K 14/18

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2002/004578

(22) Date de dépôt international :
27 décembre 2002 (27.12.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
01.17048 28 décembre 2001 (28.12.2001) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :
BIO MERIEUX [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280
MARCY L'ETOILE (FR). INSERM-INST.NAT.SANTE
ET RECHERCHE MEDICALE [FR/FR]; 101, rue
Tolbiac, F-75013 PARIS (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : CHEMIN,
Isabelle [FR/FR]; 2, Montée des Soldats, F-69300
CALUIRE (FR). TREPO, Christian [FR/FR]; 4, passage
du Verdier Sud, F-69500 BRON (FR). BEDIN, Frédéric
[FR/FR]; 6, rue Gaspard André, F-69002 LYON (FR).

(74) Mandataire : CABINET GERMAIN & MAUREAU; 12
rue Boileau, F-69006 LYON (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SK,
SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR,
IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, TR), brevet OAPI (BF, BJ,
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).

Publiée :
— avec rapport de recherche internationale

(48) Date de publication de la présente version corrigée:
22 avril 2004

(15) Renseignements relatifs à la correction:
voir la Gazette du PCT n° 17/2004 du 22 avril 2004, Sec-
tion II

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: HXHV VIRUS, NUCLEIC MATERIAL, PEPTIDE MATERIAL AND USES

(54) Titre : VIRUS HXHV, MATÉRIEL NUCLÉIQUE, MATÉRIEL PEPTIDIQUE ET UTILISATIONS

(57) Abstract: The invention concerns an isolated HXHV virus having the following characteristics: (i) a DNA genome, at least partly single-stranded; (ii) said genome comprises at least an open reading frame (ORF) encoding a protein or a polypeptide; (iii) said genome comprises a nucleotide sequence having, for each segment of at least 40 nucleotides belonging to said sequence, at least 90 % homology with SEQ ID NO: 1 or with its complementary sequence. The invention also concerns a nucleic material and a peptide material and their uses.

(57) Abrégé : Virus HXHV isolé présentant les caractéristiques suivantes : (i) un génome à ADN, au moins partiellement simple brin, (ii) ledit génome comprend au moins une trame de lecture (ORF) codant pour une protéine ou une polypeptéine (iii) ledit génome comprend une séquence nucléotidique qui présente, pour tout segment d'au moins 40 nucléotides appartenant à ladite séquence, au moins 90% d'homologie avec SEQ ID NO :1 ou avec son complémentaire, matériel nucléique et matériel peptidique et utilisations.

BEST AVAILABLE COPY

VIRUS HXHV, MATERIEL NUCLEIQUE, MATERIEL PEPTIDIQUE ET UTILISATIONS

L'hépatite est la plus importante des maladies transmissibles. Le mode de transmission est le plus souvent la transfusion, la transplantation d'organes et l'hémodialyse, mais l'hépatite peut également être transmise par ingestion de nourriture ou d'eau contaminée et par contact entre individus.

Les hépatites virales sont induites par divers agents viraux qui se distinguent les uns des autres par leurs génomes et leurs modes de réplication. Les hépatites virales causent des dommages au niveau du foie avec des degrés variables de sévérité. Près d'un milliard de personnes dans le monde souffrent d'hépatites virales. Il existe des risques graves dans les formes chroniques des hépatites qui peuvent évoluer en cirrhose ou hépatocarcinome. Les hépatites virales peuvent être diagnostiquées par mise en évidence de symptômes bien définis, tels que la jaunisse, des taux élevés de transaminases (aspartate transaminase ou AST, alanine transaminase ou ALT, lactate déshydrogénase ou LDH), et des lésions hépatiques. Mais malgré la connaissance de différents virus des hépatites A, B, C, D, E, G et TTV, 5% de toutes les hépatites et 40% des hépatites fulminantes demeurent inexpliquées, d'où l'hypothèse de l'existence de virus inconnus des hépatites. Ces hépatites sans étiologie connue sont aussi bien post-transfusionnelles que sporadiques, chroniques ou fulminantes. Elles sont communément appelées hépatites X.

Les virus des hépatites G (GBV-A, GBV-B, GBV-C) et TTV récemment identifiés ne semblent pas être pathogènes chez l'homme et ne peuvent donc pas expliquer les cas d'hépatites sans étiologie connue ou hépatites X.

A partir d'un cas d'hépatite grave sans étiologie connue, d'un patient chez lequel un traitement à l'interféron a permis de normaliser les transaminases, les

présents inventeurs ont pu cloner grâce à la technique d'hybridation soustractive " RDA " (Representational Difference Analysis) les acides nucléiques différentiellement exprimés entre le sérum au pic des transaminases et le sérum après normalisation des transaminases. 643 clones représentant des séquences ADN propres au sérum au pic des transaminases ont été criblés. De manière à exclure de possibles homologues avec le génome humain ou tout autre séquence connue, différentes voies ont été explorées :

■ hybridation des 643 clones avec une sonde " ADN génomique humain ", ce qui a permis de montrer que 593 clones s'hybrident à la sonde " ADN génomique humain " et que 50 clones ne s'hybrident pas à la sonde " ADN génomique humain " et comprennent un insert,

■ recherche dans les banques de données de possibles homologues entre les séquences de ces 50 clones et les séquences publiées, en utilisant le programme BLAST sur le site NCBI selon les paramètres donnés par le site,

■ criblage complémentaire de 4 clones sélectionnés de l'étape précédente par " Dot blot " sur l'ADN des clones sélectionnés en utilisant une sonde " ADN génomique humain " marquée radioactivement et par Southern blot d'ADN génomique humain en utilisant comme sonde les clones sélectionnés marqués radioactivement.

A l'issue de ces différentes étapes, 2 clones ADN ont été sélectionnés dont les séquences étaient inconnues dans les banques de données. Grâce à des PCRs réalisées au sein des séquences clonées, testées sur de l'ADN génomique humain provenant de donneurs de sang, en final un seul clone contenant un insert de 1400 paires de bases a été retenu pour son absence d'homologie avec l'ADN génomique humain et avec toutes séquences présentes dans les banques de données. La séquence de ce clone a été appelée XH. Cette séquence est riche en GC (62%) et présente quatre

trames de lecture ouvertes. Cette séquence isolée a ensuite été caractérisée par quatre études parallèles :

- étude bio-cliniques et épidémiologiques,
- étude moléculaire,
- 5 ■ production d'anticorps spécifiques,
- étude en microscopie électronique.

Les résultats montrent que :

- la séquence XH est retrouvée par PCR grâce à des amorces spécifiques chez 10% des patients porteurs d'une
- 10 hépatite chronique sans étiologie connue présents dans l'étude (sur 110 patients testés),

- cette séquence est absente chez les donneurs de sang testés par la même PCR spécifique de la séquence XH clonée,

- 15 ■ cette séquence est une séquence ADN au moins partiellement simple brin,

- elle présente plusieurs trames de lecture et une des trames de lecture code pour une protéine de 21kD, laquelle protéine possède une région qui présente toutes
- 20 les propriétés d'immunogénicité et d'hydrophylité requises pour induire la production d'anticorps,

- le fractionnement sur gradient de sucrose d'un sérum de patient Non A-E positif par PCR pour la séquence XH (XH+) a permis d'isoler deux fraction consécutives
- 25 (1,3-1,5 g/cm³) positives pour la séquence XH dans lesquelles ont été mises en évidence des particules dont la taille et la régularité sont compatibles avec celles d'un agent viral. Ces particules ne sont pas observées sur des fractions du gradient négatives par PCR pour la
- 30 séquence XH. Ce nouvel agent infectieux a été dénommé HXHV.

Aussi, la présente invention concerne le virus HXHV isolé et fournit des acides nucléiques et des polypeptides qui sont susceptibles d'être dérivés de HXHV. De plus,

- 35 l'invention fournit les moyens pour diagnostiquer une infection par le virus HXHV chez des patients ou des

animaux suspectés avoir une hépatite virale ainsi que les compositions pharmaceutiques ou vaccinales pour prévenir ou traiter la maladie associée à l'infection.

Ainsi, la présente invention concerne :

5 - le virus HXHV isolé présentant les caractéristiques suivantes :

(i) un génome à ADN au moins partiellement simple brin,

10 (ii) ledit génome comprend une ou plusieurs trames de lecture (ORF) codant pour une ou des protéine(s) ou polyprotéine(s) ;

15 (iii) ledit génome comprend une séquence nucléotidique susceptible de s'hybrider à la séquence SEQ ID NO : 1 ou à la séquence complémentaire de SEQ ID NO : 1 ; de préférence, il présente une séquence nucléotidique qui présente, pour tout segment d'au moins 40 nucléotides appartenant à ladite séquence, au moins 90%,
20 avantageusement au moins 95%, ou mieux encore au moins 98%, d'homologie avec SEQ ID NO : 1 ou avec son complémentaire ;

- une séquence d'acide nucléique susceptible d'être obtenue à partir du génome du virus HXHV ou des fragments dudit génome ou une séquence d'acide nucléique homologue à
25 ladite séquence d'acide nucléique SEQ ID NO : 1 ou à la séquence complémentaire de SEQ ID NO : 1, et présentant au moins 90%, de préférence au moins 95% et avantageusement au moins 98% d'homologie sur la longueur de la séquence représentée en SEQ ID NO : 1 ; le virus présentant les
30 caractéristiques définies ci-dessus ;

- un fragment nucléotidique d'ADN ou d'ARN comprenant ou consistant en une séquence nucléotidique ADN ou ARN d'au moins 12 nucléotides contigus, de préférence d'au moins 15 ou 18 nucléotides contigus, et avantageusement
35 d'au moins 21 nucléotides contigus, de la séquence nucléotidique ADN SEQ ID NO : 1 ou d'une séquence

nucléotidique qui présente au moins 90%, par exemple au moins 95% ou 98% d'homologie par rapport à la séquence représentée en SEQ ID NO : 1 ou de leur séquences ADN complémentaires ou du produit de transcription desdites

5 séquences nucléotidiques ADN ; en particulier, un fragment dont lesdits nucléotides contigus appartiennent à l'un des segments suivants : un segment dont la séquence commence au nucléotide 813 et se termine au nucléotide 1361 de SEQ ID NO : 1 et un segment dont la séquence commence au

10 nucléotide 927 et se termine au nucléotide 968 de SEQ ID NO : 1, le fragment complémentaires et le produit de transcription desdits fragments et un fragment comprenant ou consistant en SEQ ID NO : 1 ou sa séquence ADN complémentaire ou une séquence qui est le produit de

15 transcription de SEQ ID NO : 1 ;

- une molécule d'ADN qui comprend ou consiste en une séquence nucléotidique ADN représentée en SEQ ID NO : 1 ou en ce qu'elle comprend au moins un fragment nucléotidique ADN tel que défini ci-dessus ou leurs séquences

20 complémentaires ;

- une molécule d'ARN qui comprend ou consiste en une séquence nucléotidique ARN qui est le produit de transcription d'une séquence nucléotidique ADN représentée en SEQ ID NO : 1 ou d'au moins un de ses fragments tel que

25 défini ci-dessus ou leurs séquences complémentaires.

L'homologie ci-dessus recouvre les équivalents fonctionnels de la séquence SEQ ID NO : 1, c'est à dire les séquences ADN dans lesquelles au moins un codon peut être remplacé par un autre codon tout en codant pour un

30 acide aminé identique. On parle de dégénérescence du code génétique. Ainsi, les codes de l'arginine, de la sérine et de la leucine présentent une dégénérescence d'ordre 6 (c'est à dire qu'il y a six codons différents pour chacune d'elle), tandis que les codes d'autres acides aminés, tels

35 que l'acide glutamique, la glutamine, la tyrosine, l'histidine et quelques autres présentent une

dégénérescence d'ordre 2. De tous les acides aminés seuls le tryptophane et la méthionine ont une dégénérescence d'ordre 1. Il est donc clair que pour l'expression d'un polypeptide dont la séquence est par exemple représentée en SEQ ID NO : 6, on peut utiliser des séquences d'acides nucléiques variantes et fonctionnelles dont les compositions en codons sont différentes de la séquence d'acide nucléique représentée en SEQ ID NO : 1.

L'homologie définie ci-dessus vise également les mutants du virus HXHV, et en particulier ceux issus de la variabilité naturelle. En effet, il est bien connu des spécialistes que les virus ont des taux relativement élevés de mutations spontanées ou induites.

L'invention concerne également :

- 15 - un polypeptide comprenant une séquence polypeptidique ou au moins un de ses fragments, caractérisé en ce que ladite séquence polypeptidique est codée par le génome du virus HXHV ou par des fragments dudit génome, par leurs équivalents fonctionnels ou par
- 20 une séquence nucléotidique qui présente au moins 90% d'homologie, de préférence au moins 95% d'homologie et avantageusement au moins 98% d'homologie par rapport à la séquence représentée en SEQ ID NO : 1 et en ce que le virus présente les caractéristiques déterminées ci-dessus;
- 25 - un fragment polypeptidique, caractérisé en ce qu'il comprend ou consiste en une séquence peptidique d'au moins 4 acides aminés, de préférence d'au moins 5 ou 6 acides aminés et avantageusement d'au moins 7 acides aminés, de préférence encore d'au plus 15 acides aminés, en
- 30 particulier de 6 à 15 acides aminés et avantageusement de 6 à 10 ou de 8 à 12 acides aminés de la séquence peptidique représentée en SEQ ID NO : 5 ou d'une séquence peptidique fonctionnellement équivalente à SEQ ID NO : 5. Les inventeurs ont en particulier montré que dans la
- 35 séquence SEQ ID NO : 5, il existe une région de 14 acides aminés qui présente toutes les propriétés requises

d'immunogénicité et d'hydrophilicité requises pour induire une réponse humorale. Ce polypeptide de 14 acides aminés est identifiée en SEQ ID NO : 6. Ils ont encore montré que ce polypeptide de 14 acides aminés correspond à une région
5 antigénique de la séquence représentée en SEQ ID NO : 5 puisqu'il a permis de développer un protocole de test en ELISA pour la détection d'anticorps anti-HXHV chez des patients ayant une hépatite chronique Non-A Non-E. ; un fragment polypeptidique avantageux comprend ou consiste en
10 SEQ ID NO :6 ou une séquence polypeptidique fonctionnellement équivalente à SEQ ID NO :6 ;

- un fragment polypeptidique qui comprend ou qui consiste en une séquence peptidique représentée en SEQ ID NO : 5 ou une séquence peptidique fonctionnellement
15 équivalente à SEQ ID NO : 5.

Par "polypeptide", on désigne un peptide, à l'état isolé, présentant un enchaînement d'un nombre variable d'acides aminés, tel qu'un oligopeptide, une protéine, une protéine de fusion, un peptide de fusion, un peptide de
20 synthèse. Un polypeptide peut être obtenu par différentes techniques bien connues de l'homme du métier, et notamment par synthèse chimique ou par des techniques de recombinaison génétique. Les polypeptides selon l'invention peuvent être obtenus par des méthodes de
25 synthèse classique, par exemple avec un synthétiseur automatique de peptides, ou par les techniques de génie génétique comprenant l'insertion d'une séquence d'ADN codant pour ledit polypeptide dans un vecteur d'expression tel qu'un plasmide ou un virus, et la transformation de
30 cellules avec ce vecteur d'expression et culture de ces cellules.

Par séquence peptidique équivalente à une séquence peptidique de référence, on entend une séquence d'acides aminés modifiée par insertion et/ou délétion et/ou
35 substitution et/ou allongement et/ou raccourcissement et/ou modification chimique d'un ou plusieurs acides

aminés, pour autant que ces modifications préservent substantiellement voire développent les propriétés immunoréactives de ladite séquence peptidique de référence.

5 Ainsi, on entend par séquences fonctionnellement équivalentes qui conservent les propriétés immunoréactives de SEQ ID NO : 5, notamment les séquences dans lesquelles un ou plusieurs acide(s) aminé(s) est ou sont substitué(s) par un ou plusieurs autres acides aminés ; les séquences
10 dans lesquelles un ou plusieurs acide aminé de la série L est remplacé par un acide aminé de la série D, et vice-versa ; les séquences dans lesquelles on a introduit une modification des chaînes latérales des acides aminés, telle qu'une acétylation des fonctions amines, une
15 carboxylation des fonctions thiols, une estérification des fonctions carboxyliques ; une modification des liaisons peptidiques telles que par exemple des liaisons carba, rétro, inverso, retro-inverso, réduites et méthylène-oxy.

Par exemple un ou plusieurs acide(s) aminé(s) dans
20 les séquences des polypeptides de l'invention peuvent être substitué(s) par un ou plusieurs autre(s) acide(s) aminé(s) de polarité similaire qui agissent comme des équivalents fonctionnels. Des substitutions pour un acide aminé dans des séquences polypeptiques d'intérêt peuvent
25 être déterminées à partir d'autres membres de la classe auquel l'acide aminé appartient. Par exemple, les acides aminés non polaires (hydrophobes) comprennent l'alanine, la leucine, l'isoleucine, la valine, la proline, la phénylalanine, la tryptophane, la méthionine. Les acides
30 aminés neutres polaires comprennent la glycine, la sérine, la thréonine, la cystéine, la tyrosine, l'asparagine, la glutamine. Les acides aminés chargés positivement (basiques) comprennent l'arginine, la lysine et l'histidine. Les acides aminés chargés négativement
35 (acides) comprennent l'acide aspartique et l'acide glutamique. D'autres substitutions pour un acide aminé

dans des séquences polypeptidiques d'intérêt peuvent être déterminées à partir des informations contenues dans l'article de Kramer A. et al. (Molecular Immunology, Vol. 32, N°7, pp. 459-465 (1995)). Ces auteurs ont constitué
5 des banques dans lesquelles pour réduire le problème de l'explosion combinatoire du nombre de molécules, ils ont utilisés des groupes d'acides aminés constitués d'acides aminés ayant des propriétés physico-chimiques similaires et ce sont les acides aminés regroupés dans chacun de ces
10 six groupes, listés ci-dessous, qui sont considérés principalement comme équivalents dans la présente invention.

Groupe 1 : alanine, proline, glycine.

Groupe 2 : acide aspartique, acide glutamique.

15 Groupe 3 : histidine, lysine, arginine.

Groupe 4 : asparagine, glutamine, sérine, thréonine.

Groupe 5 : phénylalanine, tyrosine, tryptophane.

Groupe 6 : isoleucine, leucine, valine, méthionine.

L'équivalence d'une séquence peptidique par rapport à
20 une séquence peptidique de référence peut être définie par son identité ou son homologie, exprimée en pourcentage, avec ladite séquence de référence. Ce pourcentage est déterminé, pour une suite d'un nombre donné d'acides aminés contigus, par alignement des deux séquences,
25 déplacement de l'une par rapport à l'autre, et comparaison des acides aminés dans les deux séquences. Le pourcentage d'identité est déterminé à partir du nombre d'acides aminés qui sont identiques à des acides aminés de la séquence de référence, dans la même position. Le
30 pourcentage d'homologie est déterminé à partir du nombre d'acides aminés qui sont équivalents à des acides aminés de la séquence de référence, dans la même position.

L'invention concerne aussi une cassette d'expression fonctionnelle dans une cellule issue d'un organisme
35 procaryote ou eucaryote permettant l'expression d'une séquence d'acide nucléique ou d'un fragment d'ADN ou d'une

molecule d'ADN tels que decrits ci-dessus, place sous le contrôle des elements necessaires à son expression. La cassette d'expression est caracterisee en ce qu'elle est fonctionnelle dans une cellule issue d'un organisme
5 procaryote, en particulier *E. coli* ou d'un organisme eucaryote ou eucaryote inferieur, en particulier les cellules COS et CHO et les cellules de *Saccharomyces cerevisiae* et de *Pichia pastoris*.

L'invention concerne encore un vecteur comprenant
10 ladite cassette d'expression ; une cellule issue d'un organisme procaryote, tel que *E. coli* ou eucaryote, de preference un organisme eucaryote ou eucaryote inferieur et avantageusement une cellule COS ou CHO ou une cellule issue de *Saccharomyces cerevisiae* ou de *Pichia pastoris*
15 comprenant une cassette d'expression ou un vecteur tel(le) que defini(e) precedemment ; et le polypeptide produit par la cassette d'expression, le vecteur ou la cellule.

L'invention a pour objet un procede pour preparer un polypeptide ou un fragment polypeptidique tel que defini
20 ci-dessus qui consiste à cultiver une cellule hôte repondant aux definitions precedentes dans un milieu de culture approprie, ladite cellule hôte etant transformee avec un vecteur d'expression qui contient une sequence d'acide nucleique ADN telle que definie precedemment ou un
25 fragment nucleotidique ADN tel que defini precedemment ou une molecule d'ADN telle que definie precedemment et, à purifier ledit polypeptide produit jusqu'à un degre de purete requis.

L'invention a aussi pour objet un polypeptide
30 immunogène, caracterise en ce qu'il presente une sequence peptidique ou en ce qu'il consiste en un polypeptide tel(le) que defini(e) precedemment, en particulier le polypeptide represente en SEQ ID NO : 6. Un tel polypeptide immunogène est utilise pour la production
35 d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux ou de fragments desdits anticorps et l'invention englobe les anticorps

monoclonaux ou polyclonaux ou leurs fragments, étant obtenus par immunisation d'un animal mammifère (lapin, rat, souris) avec un tel peptide immunogène.

La production d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux est bien connue de l'homme du métier. On peut citer à titre de référence Köhler G. et Milstein C. (1975) : Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity, Nature 256 :495-497 et Galfre G. et al. (1977) Nature, 266 : 522-550 pour la production d'anticorps monoclonaux et Roda A., Bolelli G.F. : Production of high-titer antibody to bile acids, Journal of Steroid Biochemistry, Vol. 13, pp 449-454 (1980) pour la production d'anticorps polyclonaux. Des anticorps peuvent également être produits par immunisation de souris, de rat ou de lapins avec les particules virales de HXHV. Pour la production d'anticorps polyclonaux et monoclonaux, l'immunogène peut être couplé à de l'albumine sérique (peptide SA) ou à l'hémocyanine de Lymphet Keyhole (peptide KLH) comme support pour l'immunisation. Dans le cadre de la présente invention, l'immunogène identifié en SEQ ID NO : 6 est couplé à la BSA (albumine sérique bovine). Les animaux sont soumis à plusieurs injections d'immunogène, les anticorps sont prélevés dans le sérum, purifiés (Mise en contact avec une poudre de foie "normal") et sont ensuite criblés pour leur spécificité en utilisant les techniques habituelles, telles que des tests ELISA ou de Western Blot. Pour la production d'anticorps monoclonaux les animaux sont soumis à une injection d'immunogène en utilisant de l'adjuvant complet de Freund. Les sérums et les surnageants de culture d'hybridome issus des animaux immunisés sont analysés pour leur spécificité et leur sélectivité en utilisant des techniques classiques, telles que par exemple des tests ELISA ou de Western Blot. Les hybridomes produisant les anticorps les plus spécifiques et les plus sensibles sont sélectionnés. Des anticorps monoclonaux peuvent également être produits

in vitro par culture cellulaire des hybridomes produits ou par récupération de liquide d'ascite, après injection intrapéritonéale des hybridomes chez la souris. Quel que soit le mode de production, en surnageant ou en ascite, les anticorps sont ensuite purifiés. Les méthodes de purification utilisées sont essentiellement la filtration sur gel échangeur d'ions et la chromatographie d'exclusion ou la chromatographie d'affinité (protéine A ou G). Un nombre suffisant d'anticorps sont criblés dans des tests fonctionnels pour identifier les anticorps les plus performants. La production *in vitro* d'anticorps, de fragments d'anticorps ou de dérivés d'anticorps, tels que des anticorps chimères produits par génie génétique est bien connue de l'homme du métier. Il est avantageux d'utiliser des anticorps humanisés. Les formes "humanisées" d'anticorps non humains, par exemple murins, sont des anticorps chimères qui comprennent une séquence minimale dérivée d'une immunoglobuline non humaine. Pour la plupart, les anticorps humanisés sont des immunoglobulines humaines (anticorps récepteur) dans lesquelles des résidus d'une région hypervariable du récepteur sont remplacés par des résidus d'une région hypervariable d'une espèce donneur (anticorps donneur) non humaine, telle que souris, rat, lapin ou primate non humain, ayant la spécificité, l'affinité et la capacité souhaitées. Dans certains cas, les résidus (FR) de la région Fv de l'immunoglobuline humaine sont remplacés par des résidus correspondants non humains. De plus, les anticorps humanisés peuvent comprendre des résidus qui ne sont pas trouvés dans l'anticorps receveur ou dans l'anticorps donneur. Ces modifications sont effectuées pour améliorer les performances de l'anticorps. En général, l'anticorps humanisé comprendra au moins et de préférence deux domaines variables, dans lesquels tout ou à peu près tout des boucles hypervariables correspondent à une immunoglobuline non humaine et tout ou à peu près tout

des régions FR seront celles d'une immunoglobuline humaine. Les anticorps humanisés facultativement pourront aussi comprendre au moins une partie d'une région constante (Fc) d'une immunoglobuline, telle qu'une
5 immunoglobuline humaine (Jones et al., Nature 321 : 522-525 (1986) ; Reichmann et al., Nature 332 : 323-329 (1988) ; et Presta et al., Curr. Op. Struct. Biol. 2 : 593-596 (1992)).

Plus particulièrement, par fragment d'anticorps on
10 entend les fragments F(ab)₂, Fab, Fab', sFv (Blazar et al., 1997, Journal of Immunology 159 : 5821-5833 et Bird et al., 1988, Science 242 : 423-426) d'un anticorps natif et par dérivé on entend, entre autres, un dérivé chimérique d'un anticorps natif (voir par exemple Arakawa
15 et al., 1996, J. Biochem 120 : 657-662 et Chaudray et al., 1989, Nature 339 : 394-397). Ces fragments d'anticorps et dérivés d'anticorps conservent la capacité de se lier sélectivement à l'antigène cible.

L'anticorps monoclonal ou polyclonal ainsi obtenu ou
20 son fragment est incorporé dans une composition diagnostique qui est utilisée dans un procédé pour détecter au moins un polypeptide ou un fragment polypeptidique tel que défini précédemment dans un échantillon biologique, selon lequel on met en contact
25 l'échantillon biologique avec la composition dans des conditions prédéterminées qui permettent la formation de complexes anticorps/antigène et on détecte la formation desdits complexes.

L'invention a également pour objet une composition
30 diagnostique qui comprend un polypeptide ou un fragment polypeptidique tel que défini précédemment et un procédé pour détecter des anticorps dirigés contre le virus HXHV ou au moins contre un polypeptide ou un fragment polypeptidique de l'invention, selon lequel on met en
35 contact un échantillon biologique suspecté être ou pouvoir avoir été infecté par le virus HXHV avec la composition

diagnostique dans des conditions prédéterminées qui permettent la formation de complexes anticorps/antigène et on détecte la formation desdits complexes. Le procédé décrit dans la partie expérimentale et la figure annexée
5 montrent clairement que le polypeptide de l'invention ou le fragment polypeptidique SEQ ID NO : 6 permet de détecter des anticorps spécifiques du virus HXHV chez des patients ayant une hépatite Non-A Non-E.

Il est connu que lors d'une infection par un agent
10 viral, l'hôte développe des anticorps dirigés contre cet agent viral (réponse humorale). Il est montré dans la partie expérimentale que l'immunisation de lapins avec un immunogène de l'invention permettait la production d'anticorps par les lapins. Il a aussi été montré que des
15 patients ayant une hépatite Non-A Non-E ont développé des anticorps dirigés contre le virus HXHV. La présente invention a donc aussi pour objet le matériel biologique pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des êtres humains ou des animaux
20 infectés par au moins le virus HXHV et des préparations immunogènes qui peuvent être utilisées pour produire des vaccins thérapeutiques contre une infection par le virus HXHV et des vaccins prophylactiques pour prévenir une potentielle infection par le virus HXHV, lesdites
25 préparations immunogènes comprenant :

(i) soit au moins un polypeptide ou un fragment polypeptidique naturel, recombinant, ou de synthèse de l'invention; soit

(ii) le virus HXHV, par exemple sous une forme
30 atténuée ou mutée.

La présente invention a aussi pour objet l'utilisation d'au moins un anticorps monoclonal ou polyclonal ou d'au moins un fragment desdits anticorps de l'invention, spécifique d'au moins un polypeptide ou un
35 fragment polypeptidique tel que défini ci-dessus en (i) pour la préparation d'une composition pharmaceutique qui

administrée à un patient infecté par le virus HXHV a la capacité de réduire voire d'inhiber la prolifération et/ou la réplication du virus. Ces anticorps ou leurs fragments sont appelés anticorps neutralisants.

5 En conséquence, l'invention se rapporte à une composition immunogène ou vaccinale, caractérisée en ce qu'elle comprend un polypeptide ou un fragment polypeptidique de l'invention ou le virus HXHV, éventuellement associé à un véhicule et/ou adjuvant et/ou
10 diluant approprié et/ou à un excipient pharmaceutiquement acceptable ; et à une composition pharmaceutique comprenant un matériel biologique tel que défini ci-dessus, éventuellement associé à un véhicule et/ou adjuvant et/ou diluant approprié et/ou à un excipient
15 pharmaceutiquement acceptable.

Par échantillon biologique, on entend par exemple le sang, le sérum, le plasma, les prélèvements tissulaires, tels que les extraits de biopsie du foie.

Les vaccins préparés sont injectables, c'est-à-dire
20 en solution liquide ou en suspension. En option, la préparation peut aussi être émulsifiée. La molécule antigénique peut être mélangée avec des excipients qui sont pharmaceutiquement acceptables et compatibles avec l'ingrédient actif. Des exemples d'excipients favorables
25 sont l'eau, une solution saline, le dextrose, le glycérol, l'éthanol ou des équivalents et leurs combinaisons. Si désiré, le vaccin peut contenir des quantités mineures de substances auxiliaires comme des agents mouillants ou émulsifiants, des agents qui tamponnent le pH ou des
30 adjuvants comme l'hydroxide d'aluminium, le dipeptide muramyl ou leurs variations. Dans le cas des peptides, leur couplage à une plus grosse molécule (KLH, toxine tétanique) augmente quelquefois l'immunogénicité. Les vaccins sont administrés conventionnellement par injection
35 par exemple intramusculaire. Des formulations additionnelles favorables avec d'autres modes

d'administration incluent des suppositoires et quelquefois des formulations orales.

Par "véhicule pharmaceutiquement acceptable" on entend les supports et véhicules administrables à l'être
5 humain ou à un animal, tels que décrits par exemple dans Remington's Pharmaceutical Sciences 16th ed., Mack Publishing Co. Le véhicule pharmaceutiquement acceptable est de préférence isotonique, hypotonique ou présente une faible hypertonicité et a une force ionique relativement
10 basse. Les définitions des excipients et adjuvants pharmaceutiquement acceptables sont également données dans Remington's Pharmaceutical Sciences précité.

L'invention a encore pour objet :

- une sonde, caractérisée en ce qu'elle est
15 susceptible de s'hybrider dans des conditions de stringence déterminées à une séquence d'acide nucléique ou à un fragment nucléotidique d'ADN ou d'ARN ou à une molécule d'ADN ou d'ARN de l'invention ; de préférence, une sonde de l'invention comprend au moins 12 nucléotides,
20 et l'hybridation est réalisée dans des conditions de stringence correspondant à une combinaison de la température et de la concentration saline choisie approximativement entre 12 à 20°C sous le T_m ("melting temperature") du complexe sonde / séquence nucléotidique
25 à détecter ;

- une amorce, caractérisée en ce qu'elle est susceptible de s'hybrider dans des conditions de stringence déterminées à une séquence d'acide nucléique ou à un fragment nucléotidique d'ADN ou d'ARN ou à une
30 molécule d'ADN ou d'ARN de l'invention ; de préférence, une amorce de l'invention comprend au moins 12 nucléotides, et l'hybridation est réalisée dans des conditions de stringence correspondant à une combinaison de la température et de la concentration saline choisie
35 approximativement entre 12 à 20°C sous le T_m ("melting

température ") du complexe amorce / séquence nucléotidique à amplifier et/ou détecter ;

- une amorce susceptible de s'hybrider à une séquence nucléique ou à un fragment nucléotidique ou à une molécule
5 d'ADN de l'invention, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi l'une quelconque des séquences SEQ IDs NO : 19 à 22 ;

- un anticorps anti-acide nucléique, caractérisé en ce qu'il est susceptible de se lier à une séquence d'acide
10 nucléique ou à un fragment nucléotidique d'ADN ou d'ARN ou à une molécule d'ADN ou d'ARN ;

- une composition diagnostique, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une sonde ou une amorce ou un anticorps anti-acide nucléique tel que défini ci-dessus ;

15 - un procédé de diagnostic d'ADN et/ou d'ARN viral, selon lequel on prélève un échantillon d'un patient, on traite si nécessaire ledit échantillon pour en extraire l'ADN et/ou l'ARN, on met en contact ledit échantillon avec au moins une sonde ou une amorce de l'invention, dans
20 des conditions de stringence déterminées et on détecte la présence d'ADN et/ou d'ARN viral dans l'échantillon soit par mise en évidence d'une hybridation dudit ADN et/ou ARN viral avec au moins une sonde, soit par amplification dudit ADN et/ou ARN ; et

25 un procédé de diagnostic d'ADN et/ou d'ARN viral, selon lequel on prélève un échantillon de sérum ou de plasma d'un patient, on traite si nécessaire ledit échantillon pour en extraire l'ADN et/ou l'ARN, on met en contact ledit échantillon avec au moins un anticorps anti-
30 acide nucléique, ledit anticorps étant éventuellement marqué par tout marqueur approprié et on met en évidence la formation d'un complexe acide nucléique/anticorps.

La production de polynucléotides, sondes ou amorces fait partie des connaissances générales de l'homme du
35 métier. On peut notamment citer l'utilisation d'enzymes de restriction, et la synthèse chimique sur synthétiseur

automatique. Les sondes et amorces susceptibles de s'hybrider dans des conditions de stringence déterminées à une séquence nucléotidique d'ADN ou d'ARN ou à un fragment nucléotidique tel que défini précédemment font partie de
5 cette définition. Il est à la portée de l'homme du métier de définir les conditions de stringence appropriées. Des conditions de stringence caractéristiques sont celles qui correspondent à une combinaison de la température et de la concentration saline choisie approximativement entre 12 à
10 20°C sous le T_m ("melting temperature") de l'hybride à l'étude. On peut ainsi se référer à l'ouvrage de George H. Keller et Mark M. Manak, DNA PROBES, second edition, Stockton Press, 1993, 49 West 24th St., New York, N.Y. 10010 USA. Les conditions de stringence pour discriminer
15 même une seule mutation ponctuelle sont connues depuis au moins les années 1979 ; On peut citer à titre d'exemples Wallace R. B et al., DNA. Nucleic. Acids. Res. 6, 3543-3557 (1979), Wallace R. B et al., Science, 209, 1396-1400 (1980), Itakura K. and Riggs A.D., Science, 209, 1401-1405
20 (1980), Suggs S.V. et al., PNAS, 78, 6613-6617 (1981), Wallace R.B et al. DNA. Nucleic. Acids. Res., 9, 3647-3656 (1981), Wallace R.B et al. DNA. Nucleic. Acids. Res., 9, 879-894 (1981) et Conner B.J. et al., PNAS, 80, 278-282 (1983). Par ailleurs, on connaît des techniques pour la
25 production d'anticorps anti-acides nucléiques. On peut citer à titre d'exemples Philippe Cros et al., Nucleic Acides Researc, 1994, Vol. 22, N°. 15, 2951-2957 ; Anderson, W.F. et al. (1988) Bioessays, 8 (2), 69-74 ; Lee, J.S. et al. (1984) FEBS Lett., 168, 303-306 ; Malfoy, B. et al. (1982) Biochemistry, 21(22), 5463-5467 ;
30 Stollar, B.D. et al., J.J. (eds) Methods in Enzymology, Academic Press, pp 70-85 ; Traincard, F. et al. (1989) J. Immunol. Meth., 123, 83-91 et Traincard, F. et al. (1989) Mol. Cell. Probes, 3, 27-38).
35 L'invention se rapporte aussi à :

- une composition vaccinale comprenant une séquence d'ADN codant pour au moins un polypeptide ou un fragment polypeptidique de l'invention, ledit ADN étant mélangé avec un véhicule et/ou un diluant approprié ;
- 5 - un oligonucléotide anti-sens ou anti-gène, caractérisé en ce qu'il est capable d'interférer spécifiquement avec la synthèse d'au moins un polypeptide ou un fragment polypeptidique de l'invention ;
- 10 - une composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un oligonucléotide anti-sens ou un oligonucléotide anti-gène ;
- un vecteur, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un gène d'intérêt thérapeutique ou vaccinal, ledit gène codant notamment
- 15 - (i) soit au moins pour un polypeptide ou un fragment polypeptidique de l'invention;
- (ii) soit au moins pour tout ou partie d'un anticorps polyclonal ou monoclonal capable de se fixer à au moins un polypeptide ou fragment polypeptidique défini
- 20 en (i) ;
- (iii) soit au moins pour une molécule inhibitrice d'au moins un polypeptide ou fragment polypeptidique défini en (i) ;
- (iv) soit au moins pour un ligand ou toute partie
- 25 d'un ligand capable de se fixer à au moins un polypeptide ou fragment polypeptidique défini en (i) et/ou d'inhiber sa fonction ;
- une composition thérapeutique ou vaccinale, caractérisée en ce qu'elle comprend, entre autre, un
- 30 vecteur tel que défini dans la revendication 37 et en ce que ledit gène d'intérêt est placé sous la dépendance d'éléments assurant son expression *in vivo* ;
- un matériel biologique pour la préparation d'une composition pharmaceutique ou vaccinale, comprenant au
- 35 moins une cellule, notamment une cellule ne produisant pas naturellement des anticorps, sous une forme permettant son

administration dans un organisme mammifère, humain ou animal, ainsi qu'éventuellement sa culture préalable, ladite cellule étant génétiquement modifiée *in vitro* par au moins une séquence d'acide nucléique contenant au moins un gène codant *in vivo* pour au moins un polypeptide ou un fragment polypeptidique de l'invention ou codant pour au moins une molécule inhibitrice de la fonction et/ou de la fixation et/ou de l'expression d'au moins un polypeptide ou d'un fragment polypeptidique de l'invention ou codant pour au moins un anticorps ou un fragment d'anticorps capable de se lier à au moins un polypeptide ou d'un fragment polypeptidique de l'invention ;

- une cellule génétiquement modifiée, en particulier choisie parmi les cellules d'eucaryotes, telles que les cellules COS et CHO et les cellules d'eucaryotes inférieurs, telles que les cellules de levure, en particulier les cellules issues de *Saccharomyces cerevisiae* et de *Pichia pastoris*, transformées par au moins une séquence d'acide nucléique ou un fragment nucléotidique ou une molécule d'ADN ou par un vecteur de l'invention ; et

- une composition pharmaceutique ou vaccinale comprenant une telle cellule.

Les compositions pharmaceutiques définies ci-dessus sont des compositions vaccinales à ADN particulièrement avantageuses, en particulier par rapport aux compositions vaccinales " classiques " à base de protéine recombinante. En effet, l'utilisation à visée vaccinale de protéines recombinantes est un système lourd et onéreux, notamment parce qu'il exige de très importantes étapes de purification des antigènes recombinants. De plus, une des difficultés rencontrées est d'obtenir une persistance du vaccin suffisamment longue pour maintenir une bonne mémoire immunitaire. Au contraire, la méthode de vaccination par l'ADN, dont les avantages sont inhérents aux propriétés intrinsèques de l'ADN, est simple et peu coûteuse et est effectuée simplement par injection

intramusculaire ou intradermique. De plus, il convient de noter que :

- les vaccins à ADN sont non infectieux/non réplicatifs,

5 - que du fait que l'immunisation par l'ADN est une forme de transfection *in vivo*, l'antigène viral est exprimé dans les cellules mammifères sous sa conformation native,

10 - comme dans le cas d'une infection virale, une large réponse immune, à la fois humorale et cellulaire est induite, et que

- de plus, les vaccins à ADN peuvent facilement être combinés en raison de leur homogénéité physico-chimique.

15 **I. MATERIELS ET METHODES**

I-1. Source de matériel biologique.

Le matériel utilisé pour la RDA est constitué de sérums archivés en sérothèque. La RDA a été appliquée à un cas d'hépatite grave, sans étiologie connue, traité
20 avec succès par l'IFN. La normalisation des transaminases chez ce patient après traitement anti-viral et surtout la rechute après arrêt du traitement avec une nouvelle réponse lors de la reprise du traitement sont des éléments qui plaident en faveur d'une étiologie virale de la
25 maladie. Un prélèvement de sérum avant traitement et un prélèvement de sérum après traitement ont été utilisés pour la RDA, le prélèvement avant traitement contenant potentiellement le virus HXHV et le prélèvement après traitement peu ou pas de virus.

30 **I-1.1 Recherche préalable des virus connus des hépatites.**

- Criblage par des PCR ultra sensibles:

Afin d'éliminer la présence de virus connus des hépatites, qui pourraient être présents en quantité très
35 faibles ou sous la forme de mutants, des tests très sensibles de PCR pour les virus des hépatites responsables

d'hépatite chronique (B, C, G et TTV) ont été développés (Chemin et al, J of Hepatol., 2001) d'une grande sensibilité (détection de 10 génomes viraux).

Les sérums successifs du patient traité à l'interféron et destinés à la méthode d'hybridation soustractive sont demeurés négatifs par ces tests pour tous les virus connus des hépatites ainsi que pour le virus SEN (Minoru Shibata et al. The Journal of Infectious Diseases 2001 ; 184 :400-404).

10 I-1.2 Choix des échantillons pour la procédure RDA.

- Echantillons "tester" ou contrôles positifs au pic des transaminases: acides nucléiques totaux extraits du sérum prélevé au pic des transaminases.

- Echantillons "driver" ou contrôles négatifs après traitement: acides nucléiques totaux extraits du sérum prélevé au taux le plus faible des transaminases.

Les extractions des acides nucléiques sont réalisées avec le kit QIAamp® Viral RNA Mini Kit de QIAGEN. La technique différentielle est réalisée grâce au kit CLONTECH PCR - Select™ cDNA Subtraction Kit de CLONTECH selon les instructions du fournisseur.

I-2. La procédure RDA.

I-2.1 Principe.

La méthode développée par Lysitsyn et al. en 1993 repose sur le principe suivant et le kit Clontech (Clontech PCR-select™ cDNA subtraction kit) a été utilisé:

- Diminution de la complexité de l'ADN génomique.

La 1^{ère} étape de la RDA consiste à diminuer la complexité du génome. Pour cela il faut utiliser une enzyme de restriction qui a un site de coupure assez fréquent ce qui permet de réduire la complexité du génome. Le résultat de cette étape est l'obtention d'un ensemble de séquences de moindre complexité quoique représentatifs des séquences initiales, d'où le terme de "representational". La réduction préalable de la

complexité du génome à étudier améliore l'efficacité des étapes d'enrichissement en facilitant l'hybridation complète des échantillons.

- Enrichissement

5 Des adaptateurs sont raboutés (grâce à une ligase) à chaque extrémité des fragments d'ADN de l'échantillon "tester" contenant le génome viral. L'échantillon "driver" n'a pas d'adaptateurs.

10 Lors de l'hybridation soustractive le "tester" est mis en présence d'un excès de "driver". Le "driver" D contient de nombreux fragments d'ADN communs avec le "tester" T et joue donc le rôle d'inhibiteurs compétitifs en limitant l'auto-hybridation des fragments d'ADN du "tester" commun aux deux populations.

15 L'ensemble est soumis à un processus de dénaturation/renaturation au cours duquel trois types d'association vont se produire en fonction de la complémentarité des séquences.

20 Le "driver" étant en large excès, les fragments communs aux deux pools forment essentiellement des hybrides D/D (sans adaptateurs) et aussi des hybrides T/D (avec un adaptateur à l'extrémité de l'un des deux brins). Seuls les hybrides T/T possèdent à chaque extrémité les adaptateurs qui seront complétés lors de l'étape
25 d'élongation précédant la PCR. En répétant plusieurs fois la procédure après avoir sélectionné les duplex T/T, il est théoriquement possible de purifier les séquences présentes uniquement dans le "tester". Cependant l'efficacité de la technique d'hybridation soustractive
30 est limitée en partie à cause de la grande complexité du génome humain et de l'abondance de séquences d'ADN génomique dans tout échantillon de sérum. La répétition d'étape soustractive aboutit à un facteur d'enrichissement final de 10^2 à 10^3 , alors que l'on recherche un facteur de
35 10^6 .

Il est donc nécessaire d'associer à cette méthode un second moyen d'enrichissement dit cinétique. Ceci est réalisé grâce à une étape de PCR qui utilise des amorces complémentaires des adaptateurs ajoutés lors de l'étape précédente. Les duplex T/T sont donc amplifiés exponentiellement par PCR et les duplex T/D subissent une amplification linéaire dont les fragments issus sont simples brins. Les hybrides T/D ne sont quant à eux pas amplifiés. Il est possible de détruire les ADN simple brin par une nucléase qui épargne les ADN double brin. Ce procédé d'enrichissement sélectif des " testers " double brin peut être répété avec différents adaptateurs pour enrichir l'ADN cible par rapport aux autres séquences du "tester" après amplification. En général, trois cycles de cette réaction permettent d'obtenir le facteur d'enrichissement de 10^6 de la séquence virale à rechercher. Par la suite les produits obtenus sont sous clonés dans un plasmide pour séquençage et analyse.

20 I-2.2 Protocole.

La RDA est réalisée sur les échantillons " tester " et " driver " à partir des ADNs du patient préalablement cité.

• Digestion des échantillons par l'enzyme de restriction *Rsa I*

La procédure est réalisée séparément pour l'ADN du "tester" et l'ADN du "driver".

Afin de ne négliger aucune piste, une expérience de RDA a été effectuée en parallèle avec les ARN sur les mêmes échantillons. Cependant, aucun clone, dont la séquence n'ait pas d'homologie avec des séquences connues, n'a pu être obtenu à partir de l'ARN viral.

Préparation du mélange suivant :

Le mélange tampon *Rsa I* 10 X (5 μ L), *Rsa I* (10 u/ μ L) (1,5 μ L), acides nucléiques 43,5 μ L (2 μ g) est préparé. Le mélange est incubé 1h30 à 37°C et la réaction est stoppée

avec 2,5 µL de 20X EDTA/glycogène. Une extraction est réalisée avec 50 µL de phénol : chloroforme : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1). Une centrifugation est effectuée pendant 10 min. à 14000 tpm et la phase aqueuse supérieure est prélevée. Une nouvelle extraction est réalisée avec 50 µL de chloroforme : isoamyl alcohol (24 : 1), suivie d'une centrifugation pendant 10 min. à 14000 tpm et prélèvement de la phase aqueuse supérieure. La phase aqueuse est précipitée avec 25 µL de NH₄OAc 4M et 187,5 µL d'éthanol 95%, suivie d'une centrifugation pendant 20 min. à 14000 tpm et élimination du surnageant. Le culot est lavé avec 200 µL d'éthanol 80%. Une nouvelle centrifugation est effectuée pendant 5 min. à 14000 tpm et le surnageant est éliminé. Le culot est séché à l'air 5 à 10 min. puis dissous dans 5,5 µL d'H₂O.

• Ligation du "tester" aux adaptateurs (qui contiennent les séquences des amorces PCR, nécessaires à la phase finale de la procédure) :

1µL du " tester " est dilué dans 5 µL d'eau. Le mélange de ligation est préparé comme suit : H₂O (15 µL), tampon de ligation 5 X (BIOLABS) (10 µl), T4 ADN ligase (400u/µL) BIOLABS (5 µL).

Le mélange 1.1 a été préparé comme suit : " tester " 2 µL, adaptateur 1 (10µM) 2 µL, Master mix 6 µL.

Le mélange 1.2 a été préparé comme suit : " tester " 2 µL, adaptateur 2R (10µM) 2 µL, Master mix 6 µL.

Préparation du contrôle non soustrait : 2 µL du mélange 1.1 ont été additionnés à 2 µL du mélange 1.2. Le mélange ainsi constitué est incubé 1 nuit à 16°C et la réaction est stoppée par addition de 1 µL de 20 X EDTA/glycogène. La ligase est inactivée à 72°C pendant 5 min. et le mélange est refroidi dans la glace.

• Hybridation soustractive : " tester - driver ".

La procédure est réalisée séparément pour l'ADN du " tester " et l'ADN du " driver ".

Première hybridation :

Deux mélanges H1 et H2 ont été réalisé séparément constitués de l'ADN du "tester" ligaturé avec l'adaptateur 1 (mélange H1) ou l'adaptateur 2R (mélange H2). Mélange H1 : "driver" 1,5 µL, "tester 1 - 1" 1,5µL, tampon d'hybridation 4 X 1µL. Mélange H2 :
5 "driver" 1,5 µL, "tester 1 - 2" 1,5µL, tampon d'hybridation 4 X 1µL. De l'huile a été ajoutée à chacun de ces mélanges et chaque mélange est incubé pendant 1 min.30 à 98°C puis 6 h à 68°C avant de procéder
10 immédiatement à la deuxième hybridation.

Deuxième hybridation :

Le mélange suivant est préparé: "driver" 1 µL, tampon d'hybridation 4 X1 µL, H₂O2 µL.

1 µL du mélange est dénaturé à 98°C pendant 1 min.
15 30.

15 µL du mélange H2 sont prélevés à l'interface huile/échantillon. L'air est aspiré, le "driver" est prélevé et le tout est ajouté au mélange H1. L'ensemble est incubé à 68°C pendant la nuit.

20 Dilution des ADN soustraits :

Aux tubes hybridés sont ajoutés 200 µL de tampon de dilution. Le mélange après aspirations et refoulements est incubé à 68°C pendant 7 min. et la réaction est stoppée dans la glace.

25 • PCR sur les produits de RDA.

La procédure est réalisée séparément sur :

- les produits de RDA dérivant des ADNs,
- le contrôle non soustrait, le contrôle soustrait du kit et le témoin positif PCR du kit.

30

Premier tour de PCR :

Le mélange suivant est préparé: H₂O 19,5 µL, tampon PCR 10 X 2,5 µL, dNTPs (10 mM de chaque) 0,5 µL, PCR amorce 1(10 µM) 1 µL, 50 X advantage cDNA polymerase mix
35 0,5 µL, échantillons RDA 1 µL.

Le programme utilisé est le suivant: 75°C 5min, 94°C 30sec

Puis 25 cycles: 94°C 10sec, 66°C 30sec, 72°C 1min30

Deuxième tour de PCR:

5 Utilisation de 1µl du produit de première PCR. Le même mélange est utilisé.

20 cycles sont effectués: 94°C 10sec, 68°C 30sec, 72°C 1min30.

10 Les couples d'amorces du kit Clontech PCR-select™ cDNA subtraction sont utilisées, elles sont situées dans les adaptateurs "liés" à l'ADN "tester" au début de la procédure RDA.

15 Analyse de 8 µL d'échantillon sur gel d'agarose 1 % en TBE 1X avec coloration au Bromure d'éthidium.

Les produits de RDA sont ensuite ligués dans le plasmide pTOPO grâce à la topoisomérase I, puis clonés dans *E. coli* à l'aide du kit TOPO TA Cloning® Kit de Invitrogen.

20

II - ANALYSE DES PRODUITS DE RDA

II-1. Criblage des clones générés par RDA.

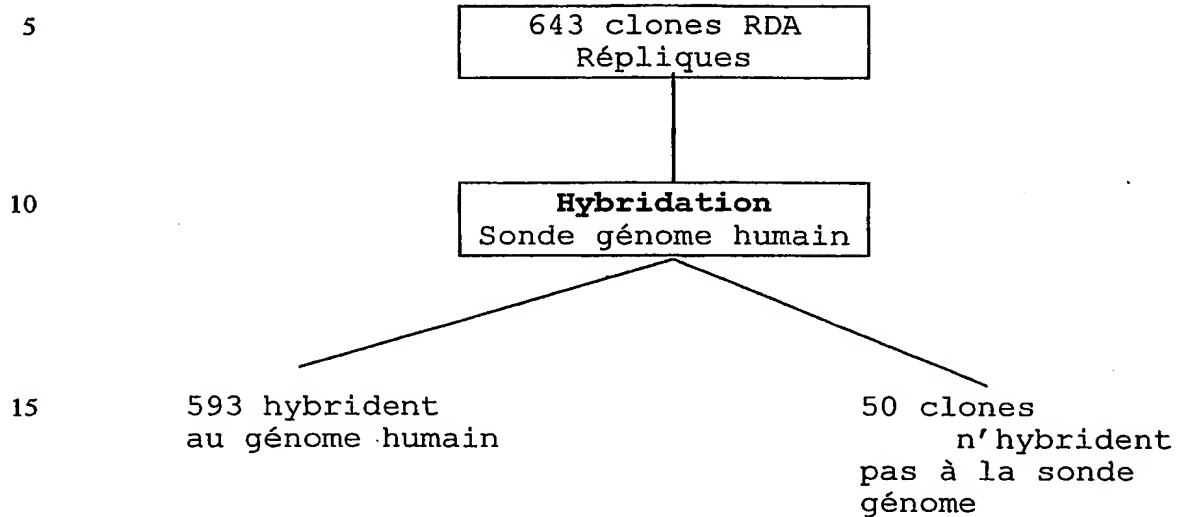
25 La technique RDA permet d'obtenir à partir des échantillons "tester" et "driver" des produits de PCR qui reflètent ce qui est potentiellement différent entre les deux échantillons. Ce qui constitue le matériel soustrait.

30 Après clonage des produits de RDA 643 clones ont été criblés selon les étapes décrites ci-après.

II-2 Répliques des produits de clonage.

35 Afin d'éliminer un maximum de clones d'origine humaine, les répliques des clones RDA "ADN" sont hybridées avec des sondes correspondant à de l'ADN génomique humain digéré par *Eco RI* / *Pst I* et radiomarquées au ³²p.

Les résultats à l'issue de ce criblage sont présentés ci-dessous.



II-3. Interrogation de banques de données

Les cinquante clones sélectionnés à l'issue de la première étape sont séquencés. Leurs séquences respectives sont comparées aux séquences connues dans les banques de données Swissprot, Embl, Genbank, Draft du génome humain. Un certain nombre apparaît inconnu. Les résultats de la répartition des séquences sont donnés ci-dessous.

	Phosphatase	23%
30	ADN humain chromosomes 16 + 17	31%
	Protéinase	8%
	Immunoglobuline humaine	16%
	Inconnues	8%

35 II-4 Criblage complémentaire.

Des étapes supplémentaires de criblage ont été réalisées sur les 4 clones sélectionnés à l'étape précédente selon le processus décrit ci-dessous.

• " Dot blot " sur l'ADN des clones sélectionnés en utilisant une sonde ADN génomique *Eco RI / Pst I* radiomarkée au ^{32}P .

• Southern blot d'ADN génomique en utilisant comme
5 sonde les clones sélectionnés préalablement marqués au ^{32}P .

A l'issue de ces différentes étapes, deux clones " ADN ", dont les séquences sont inconnues dans les banques de données, ont été sélectionnés.

L'étape suivante est la validation de la pertinence
10 de ces données à la fois sur des échantillons provenant de patients atteints d'hépatite d'étiologie indéterminée et des témoins constitués d'une part des donneurs de sang et d'autre part des patients souffrant de pathologies du foie d'origine non virale. Pour cela, des amorces ont été
15 synthétisées au sein de l'ADN des deux clones et des PCRs ont été réalisées en utilisant ces amorces sur l'ADN génomique extrait du sérum de donneurs de sang afin d'éliminer la possibilité que l'ADN des clones ne corresponde à une séquence ADN fréquente dans le génome
20 humain.

Un clone contenant un insert de 1400bp (XH) provenant de la RDA sur ADN a été sélectionné pour son absence d'homologies avec l'ADN génomique humain et avec toute séquence présente dans les bases de données.

25 Cette séquence, riche en GC (62%) présente plusieurs phases de lecture ouvertes. Elle est identifiée en SEQ ID NO :1. Les phases de lecture ouvertes sont identifiées en SEQ ID NO, : 2, 3, 4 et 5.

30 III. Caractérisation de la séquence associée aux hépatites X : XH

Quatre approches parallèles ont été mises en œuvre afin de caractériser et préciser la nature de la séquence XH isolée :

- 35 ✓ Etudes bio-cliniques et épidémiologiques
 ✓ Approche " Moléculaire "

- ✓ Production d'anticorps spécifiques
- ✓ Etude en microscopie électronique

III-1 Etudes bio-cliniques et épidémiologiques

- 5 - Différents jeux d'amorces et de sondes ont été synthétisés afin de pouvoir amplifier par PCR la séquence XH.

Il est possible d'utiliser la combinaison d'amorces suivante :

- 10 Amorce sens (1M13):

5'-CCCGCCCCGCTGATGAAAAG-3' (SEQ ID NO :10)

Amorce antisens (3T7):

5'-ATGCCAACGCCAGAGTCCG-3' (SEQ ID NO :13)

- 15 Cycles de PCR : 75°C 5 min., 94°C 2 min., 94°C 10 s x 28, 66°C 30 s x 28, 72°C 1 min. 30 x 28 et 72°C 7 min.

Deuxième tour de PCR :

3 µL d'échantillons du 1^{er} tour ont été dilués avec 27 µL d'eau.

- 20 Le mélange suivant a été préparé: H₂O 17,5 µL, tampon PCR 10 X 2,5 µL, dNTPs (10 mM de chaque) 0,5 µL, PCR nichée amorce sens (10 µM) 1 µL, PCR nichée amorce anti-sens 2R (10 µM) 1 µL, 50 X avantage cDNA polymerase mix 0,5 µL, échantillons RDA 1/10 2 µL.

Les couples d'amorces suivants ont été utilisés :

- 25 Amorce sens (1M13):

5'-CCCGCCCCGCTGATGAAAAG-3' (SEQ ID NO :10)

Amorce antisens (1T7):

5'-GATGTTTCTGTGTCTGTGGG-3' (SEQ ID NO :14)

- 30 Cycles de PCR : 94°C 2 min., 94°C 10 s x 10-15, 68°C 30 s x 10-15, 72°C 1 min. 30 x 10-15 et 72°C 7 min.

Tout d'abord, 90 donneurs de sang ayant des transaminases normales ont été criblés par PCR. Tous sont négatifs pour la séquence XH.

- 35 - En parallèle la présence de la séquence XH à différentes dates dans le sérum du patient ayant permis de

réaliser la RDA a été recherchée. La présence de la séquence XH a été constatée uniquement au moment où les transaminases étaient particulièrement élevées. L'analyse d'une biopsie de foie de ce patient après la chute des transaminases révèle la présence de cette séquence. Il faut noter, dans ce cas, que le patient est traité par l'interféron désormais depuis 10 ans et que toute tentative d'arrêt du traitement a pour conséquence une augmentation rapide des transaminases suggérant la présence persistante de l'agent en cause dans la maladie du foie.

- Vingt cas de cirrhose biliaire primitive sont demeurés également négatifs pour la séquence XH au niveau du sérum et du foie. Quatre cas d'hépatites médicamenteuses ont également été étudiés et se sont également révélés négatifs. Seuls 1/21 cas d'hépatite auto-immune et 1/7 cas d'hépatite alcoolique étaient positifs pour la séquence XH. Ces résultats sur des populations contrôles ont permis de vérifier que la séquence XH n'est pas habituellement présente dans le sérum humain " normal " ou dans le contexte de lésions du foie d'étiologie non virale.

- De manière très intéressante, l'analyse d'échantillons de foie et de sérum de patients de l'Hôtel Dieu de Lyon, souffrant d'une hépatite chronique Non-A Non-E a permis de constater que 10% d'entre eux (11/109) sont porteurs de la séquence XH. Un pourcentage similaire de patients positifs pour l'ADN de HXHV est obtenu chez des patients marocains ayant une hépatite chronique Non-A Non-E.

- Les patients positifs par PCR dans le sérum pour la séquence XH sont apparus également positifs au niveau de l'ADN extrait de biopsies de foie lorsque la biopsie était disponible. La présence de la séquence XH a pu être observée à différentes dates, espacées de plusieurs années, pour un même patient.

- produits amplifiés par PCR qui ont été séquencés et montrent une séquence très similaire d'un patient à l'autre.

5 - Ces patients ont tous une hépatite chronique avec des degrés variables au niveau des lésions du foie, depuis l'hépatite minime jusqu'à la cirrhose. Certains seulement ont été transfusés ce qui constitue un facteur de risque clairement établi quant à la transmission d'un virus des hépatites. Ces patients n'étant porteur d'aucun
10 virus connu des hépatites n'ont intégrés aucun protocole de traitement antiviral.

- De plus, l'analyse de treize cas d'hépatite aiguë Non-A Non-E du Brésil a permis de détecter la présence de la séquence XH chez onze de ces patients à la phase aiguë.
15

III-2 Approche " moléculaire "

Afin de déterminer la nature de l'ADN isolé (simple brin ou double brin) la séquence XH a été capturée avec alternativement deux oligonucléotides spécifiques de l'un
20 ou l'autre des deux brins ADN de la séquence XH fixés sur des particules magnétiques (Gene Trapper cDNA positive selection system, Gibco BRL (nom commercial)). Les oligonucléotides utilisés sont les suivants :

oligonucléotide sens S6M13:

25 5'-GCCATGTAAC TCGGCAGTGC-3' (SEQ ID NO :9)

oligonucléotide antisens Comp S6M13:

5'-GCACTGCCGAGTTACATGGC-3' (SEQ ID NO :15)

Dans un deuxième temps les produits relargués après
30 capture avec les oligonucléotides spécifiques sont analysés par :

- PCR et hybridation des produits de PCR avec une sonde spécifique de XH.

- Clonage, analyse des clones par PCR, hybridations
35 des répliques des-produits clonés, séquençage des clones.

Cette démarche a été validée sur la séquence XH clonée dans le vecteur TOPO. Sous cette forme, la séquence issue de la RDA est double brin puisque issue d'une PCR. La procédure de capture réalisée sur la
5 séquence clonée permet en final de capturer les deux brins d'ADN présents.

La nature de la séquence XH qui circule chez les patients a été recherchée à partir de plusieurs sérums de patients " hépatite X ", positifs par PCR pour la
10 séquence XH. Les sérums sont ou non ultracentrifugés avant le procédé de capture.

L'ensemble de ces résultats démontre que seul l'un des oligonucléotides (l'oligonucléotide sens, S6M13) est capable de retenir la séquence XH qui circule dans le
15 sérum des patients. En conséquence, cette séquence est au moins partiellement simple brin. Cette hypothèse sur la nature simple brin de l'ADN de XH est étayée par des essais de traitements préalables de l'ADN de XH par la nucléase S1, enzyme spécifique des formes simple brin
20 d'ADN. Le traitement préalable d'extraits de sérums positifs pour l'ADN de XH abolit le signal PCR et confirme donc la nature simple brin de la séquence.

III-3 Production d'anticorps spécifiques.

25 - La séquence XH (SEQ ID NO : 1) présente quatre phases de lecture ouvertes. L'ORF1 est présentée en SEQ ID NO : 2, elle comprend 101 acides aminés codés par les bases 1 à 103 de SEQ ID NO : 1. L'ORF2 est présentée en SEQ ID NO : 3, elle comprend 135 acides aminés codés par
30 les bases 829 à 1233 de SEQ ID NO : 1. L'ORF3 est présentée en SEQ ID NO : 4, elle comprend 135 acides aminés codés par les bases 270 à 674 de SEQ ID NO : 1. L'ORF4 est présentée en SEQ ID NO : 5, elle comprend 183 acides aminés codés par les bases 813 à 1361 de SEQ ID
35 NO : 1. Par analyse informatique il a été montré que la protéine choisie possède une région de 14 acides aminés

qui a toutes les propriétés d'immunogénicité et hydrophilicité requises pour induire la production d'anticorps.

- Un polypeptide correspondant à la zone des 14 acides aminés précitée a été synthétisé pour la production d'anticorps polyclonaux. La séquence de ce polypeptide est donnée ci-dessous et référencée en SEQ ID NO : 6.

RRAAELHRRDQYRL

Pour l'immunisation des lapins, une cystéine (C) a été ajoutée à l'extrémité COOH terminale de ce polypeptide pour le couplage à la BSA. L'immunogène RRAAELHRRDQYRLC-BSA a été injecté aux lapins à raison de 100 µg d'immunogène par lapin et par injection. Le protocole d'immunisation utilisé est le suivant :

J0 : 1^{ère} prise de sang de 10 mL, immunisation : 0,1 mg d'immunogène (1 mg/mL) + 0,4 mL d'eau physiologique + 0,5 mL AFC 1 mL en ID (0,1 mL x 10)

J28 : 0,1 mg d'immunogène (1 mg/mL) + 0,4 mL d'eau physiologique + 0,5 mL AFI en ID-1 mL en ID (0,1 mL x 10)

J56 : 0,1 mg d'immunogène (1 mg/mL) + 0,4 mL d'eau physiologique + 0,5 mL AFI-1 mL en SC (0,25 mL x 4)

J63 : 1^{ère} prise de sang de 3 mL à l'oreille sans anticoagulant

J84 : 0,1 mg d'immunogène (1 mg/mL) + 0,4 mL d'eau physiologique + 0,5 mL AFI 1 mL en IM (0,25 mL x 4)

J91 : 2^{ème} prise de sang de 9 mL à l'oreille sans anticoagulant

J112 : 0,1 mg d'immunogène (1 mg/mL) + 0,4 mL d'eau physiologique + 0,5 mL AFI-1 mL en ID (0,1 mL x 10)

J119 : 3^{ème} prise de sang de 9 mL à l'oreille sans anticoagulant.

La production d'anticorps spécifiques est un outil très efficace pour le criblage de l'expression de la séquence XH sur des biopsies de patients Non-A Non-E en parallèle avec d'autres catégories de patients ou de contrôles.

- Le polypeptide de 14 acides aminés (SEQ ID NO :6) est utilisé pour la mise au point d'un test ELISA pour la capture d'anticorps spécifiques du virus HXHV potentiellement présents chez des patients ayant une

5 hépatite chronique Non-A Non-E. Dans les puits d'une plaque de microtitration sont déposés 100 µL de streptavidine diluée au 1/100 dans un tampon carbonaté. Le dépôt est suivi d'une incubation pendant 2 heures à 37°C dans une étuve, après laquelle trois lavages sont

10 effectués. 100 µL du peptide biotinylé, dilué au 1/100 dans du PBS, sont ensuite ajoutés dans chacun des puits. Le mélange est incubé pendant une nuit à 4°C. Trois lavages sont ensuite réalisés. 250 µL de PBS + sérum de chèvre sont ensuite ajoutés afin de saturer les sites.

15 L'ensemble est incubé pendant 2 heures à 37°C. Après trois lavages, 100 µL de chaque sérum à tester (dilué à la dilution appropriée dans du PBS Tween + SC) sont ajoutés et une incubation est réalisée pendant 2 heures à 37°C en étuve. Trois lavages sont ensuite réalisés et 100 µL d'une

20 solution diluée d'anticorps anti-IgG humain couplé à la peroxydase sont déposés. L'ensemble est incubé en étuve pendant une heure à 37°C. L'incubation est suivie d'une étape de trois lavages. La révélation est réalisée par addition d'ortho-phenylènediamine (100 µL). La réaction

25 est bloquée par addition de 50 µL d'H₂SO₄ et la lecture est effectuée aux DO 492nm et 635nm. Les résultats sont présentés dans la figure annexée. Comme cela ressort de cette figure 6 patients sont très bien détectés par cette

30 technique parmi les 16 chez lesquels le séquence XH avait été détectée par PCR. Un septième patient est détecté faiblement, à la limite du seuil.

III-4 Etude en microscopie électronique

- Des gradients de sucrose ont été réalisés afin d'isoler

35 d'éventuelles particules virales associées à la présence de la séquence XH. Pour cela, le sérum d'un patient de la

cohorte d'hépatites Non-A Non-E a été utilisé. Deux fractions consécutives de ce gradient sont apparues positives par PCR pour la séquence XH. Ces fractions correspondent à des densités de l'ordre de 1,2 à 1,5 g/cm³.

5 L'étude en microscopie électronique a permis d'observer des particules dont la taille et la régularité (110nm de diamètre) sont compatibles avec celle d'un agent viral. La fréquence avec laquelle ces particules sont observées en microscopie électronique suggère une concentration de

10 l'ordre de 5x10⁵ particules/ml de sérum.

Le test ELISA mis au point nous a permis de rechercher la présence d'anticorps "anti-XH" chez des donneurs de sang et dans différentes catégories de patients.

15

IV ETUDE SUR DES DONNEURS DE SANG ET DES PATIENTS

IV-1. Recherche d'anticorps anti-XH

La recherche d'anticorps anti-XH chez des donneurs de sang et dans différentes catégories de patients a été

20 réalisée par test ELISA. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau

Donneurs de sang			Patients						
	TN	TE	VHC+	VHB+	VIH+	Non A-E*	Non A-E**	H*	H**
Nombre total étudié	408	389	45	40	31	44	13	47	41
% de positifs anti-XH	1,22	6,2	3	16	35	23	31	36	17

5 TN signifie « donneurs de sang ayant un taux de transaminases normale »

TN signifie « donneurs de sang ayant un taux de transaminases élevé »

VHC+ signifie « patients VHC positifs »

VHB+ signifie « patients VHB positifs »

10 VIH+ signifie « patients VIH positifs »

Non A-E* signifie « patients atteints d'une hépatite non A-E chronique »

Non A-E** signifie « patients atteints d'une hépatite non A-E fulminante »

15 H* signifie « patients hémophiles ayant été transfusés avant 1987, c'est à dire avant traitement du sang par des solvants détergents »

H** signifie « patients hémophiles ayant été transfusés après 1987 »

20

La différence de prévalence des anticorps anti-XH entre les 408 donneurs de sang ayant des transaminases normales et les 389 donneurs de sang ayant de transaminases élevées est significative. Cette différence, observée entre ces deux groupes testés en double aveugle, suggère une relation causale entre la présence des anticorps anti-XH et la maladie hépatique. Une fraction des donneurs de sang ayant des transaminase élevées (20%) est retrouvée positive en PCR pour la séquence XH. Cette séquence n'a jamais été retrouvée chez les donneurs de sang ayant des transaminases normales.

Un pourcentage plus élevé de positivité en anticorps anti-XH est retrouvé pour les patients VIH positifs (35%), comparé aux 16% chez les patients porteurs chroniques du VHB et aux 3% chez les porteurs chroniques du VHC. L'étude
5 détaillée des facteurs de risque auxquels les patients ont été exposés démontre que la séquence XH est transmissible par voie parentérale et sexuelle.

Seuls les patients ayant une hépatite chronique ou
10 fulminante Non-A Non-E positifs en ELISA sont positifs par PCR dans 50% des cas, alors qu'aucun positif en ADN n'a été détecté dans le groupe des patients VHC, VHB ou parmi les hémophiles.

15 Une étude a également été menée sur des patients atteints d'hépatite aiguë d'étiologie inconnue évoluant vers la chronicité ou la guérison. Sur 13 cas étudiés, 11 se sont révélés positifs en anticorps anti-XH durant la phase aiguë de la maladie. Parmi les cas ayant pu être
20 suivis, tous sont demeurés positifs en anticorps dans le temps.

IV-2. Recherche de la séquence XH par PCR

Une méthode de PCR quantitative en temps réel
25 utilisant le Light cycler Roche® a été développée pour amplifier la séquence XH. Elle a été utilisée, entre autres, pour amplifier la séquence XH dans l'ORF 4 chez les 11 patients qui s'étaient révélés être positifs en anticorps anti-XH.

30 Les quatre amorces spécifiques décrites ci-dessous ont été synthétisées et purifiées sur HPLC.

S1 (sens) : 5'-GCGTTGTGGTTCTGTTGC-3' (SEQ ID NO: 19)

S2 (sens) : 5'-GATCAATATCGCCTACGC-3' (SEQ ID NO: 20)

AS1 (anti-sens) : 5'-CTGAAGGATAGGGCTGATG-3' (SEQ ID NO 21)

35 AS2 (anti-sens) : 5'-CTGTTGCCAGCCACCAG-3' (SEQ ID NO 22)

La PCR est réalisée à partir du kit Qiagen® « QuantiTect SYBR Green PCR Kit » (nom commercial).

La composition du mélange de réaction est la suivante

5	Master mix quantitect Qiagen	10µl
	Amorce sens (15µM)	1µl
	Amorce anti-sens (15µM)	1µl
	ADN cible	5µl
	Eau (sans RNase)	3µl
10	Volume total par capillaire	20µl

Une fois les 20µl déposés, les capillaires sont scellés, centrifugés brièvement et placés dans le rotor du Light Cycler.

15

Protocole de la PCR.

- Activation :

95°C pendant 15 minutes.

20

- Amplification/Quantification :

	Nombre de cycles	45		
		Dénaturation	Hybridation	Elongation
	Température [°C]	95	52	72
25	Incubation [s]	0	5	Tx*
	Taux de transition de température [°C/s]	20	20	20
	Tx* : température dépendant de la combinaison d'amorces utilisée.			

30

	Amorces	Taille de l'amplicon (pb)	Tx (s)
	S1/AS1	441	18
	S1/AS2	312	13
	S1/AS2	331	13
35	S2/AS2	232	10

- Analyse de la courbe de fusion :

	Dénaturation	Hybridation	Elongation
Température [°C]	95	40	95
Incubation [s]	0	5	0
5 Taux de transition			
de température [°C/s]	20	20	0,3

- Refroidissement :

40°C pendant 30 secondes.

- 10 • Caractérisation et seuil de détection de la séquence d'intérêt.

Le seuil de détection théorique de la séquence XH insérée dans le plasmide se situe entre 1 et 2 copies par capillaire. Le T_m de l'amplicon S1/AS2 (312 pb) le plus
15 fréquemment utilisé est de 88°C.

L'application de cette technique montre, entre autres, que quatre sur cinq des patients ayant évolués vers une hépatite chronique sont positifs par PCR pour la séquence
20 XH. A l'inverse cinq sur six des patients ayant guéris sont devenus négatifs par PCR pour la séquence XH.

REVENDEICATIONS

1. Virus HXHV isolé présentant les caractéristiques suivantes :

- 5 (i) un génome à ADN, au moins partiellement simple brin,
- (ii) ledit génome comprend au moins une trame de lecture (ORF) codant pour une protéine ou une polyprotéine
- 10 (iii) ledit génome comprend une séquence nucléotidique qui présente, pour tout segment d'au moins 40 nucléotides appartenant à ladite séquence, au moins 90% d'homologie avec SEQ ID NO :1 ou avec son complémentaire.

15 2. Virus selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite séquence selon (iii) présente, pour tout segment de 40 nucléotides appartenant à ladite séquence, au moins 95% d'homologie avec SEQ ID NO : 1 ou avec son complémentaire.

20 3. Virus selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que ladite séquence selon (iii) présente, pour tout segment de 40 nucléotides appartenant à ladite séquence, au moins 98% d'homologie avec SEQ ID NO : 1 ou avec son complémentaire.

25 4. Virus selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que son génome comprend au moins une trame de lecture codant pour une séquence peptidique choisie parmi SEQ ID NO : 2-6.

30 5. Séquence d'acide nucléique susceptible d'être obtenue à partir du génome du virus HXHV tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 4.

6. Fragment nucléotidique d'ADN, caractérisé en ce qu'il comprend ou consiste en une séquence nucléotidique d'au moins 12 nucléotides contigus appartenant à SEQ ID
35 NO : 1 ou à son complémentaire.

7. Fragment selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il comprend ou consiste en au moins 15 nucléotides contigus appartenant à SEQ ID NO : 1 ou à son complémentaire.

5 8. Fragment selon la revendication 6 ou 7, caractérisé en ce qu'il comprend ou consiste en au moins 18 nucléotides contigus appartenant à SEQ ID NO : 1 ou à son complémentaire.

9. Fragment selon l'une quelconque des revendications 6 à 8, caractérisé en ce qu'il comprend ou consiste en au moins 21 nucléotides contigus appartenant à SEQ ID NO : 1 ou à son complémentaire.

10. Fragment selon l'une quelconque des revendications 6 à 9, caractérisé en ce que lesdits 15 nucléotides contigus appartiennent au segment commençant au nucléotide 813 et se terminant au nucléotide 1361 de SEQ ID NO :1, ou fragment complémentaire.

11. Fragment selon l'une quelconque des revendications 6 à 9, caractérisé en ce que lesdits 20 nucléotides contigus appartiennent au segment commençant au nucléotide 927 et se terminant au nucléotide 968 de SEQ ID NO :1, ou fragment complémentaire.

12. Fragment selon l'une quelconque des revendications 6 à 11, caractérisé en ce qu'il comprend ou 25 consiste en SEQ ID NO :1 ou son complémentaire.

13. Produit de transcription d'un fragment tel que défini à l'une quelconque des revendications 6 à 12, ou de son complémentaire.

14. Molécule d'ADN, caractérisée en ce qu'elle 30 comprend ou consiste en un fragment tel que défini à l'une quelconque des revendications 6 à 12, ou en son complémentaire.

15. Molécule d'ARN, caractérisée en ce qu'elle comprend ou consiste en un produit de transcription tel 35 que défini à la revendication 13.

16. Polypeptide dont la séquence polypeptidique est codée par le génome d'un virus HXHV tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 4.

17. Fragment peptidique comprenant ou consistant en
5 une séquence peptidique d'au moins 7 acides aminés appartenant à SEQ ID NO : 5.

18. Fragment selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'il comprend ou consiste en SEQ ID NO :5.

19. Fragment selon la revendication 16, caractérisé
10 en ce qu'il comprend ou consiste en une séquence peptidique d'au plus 15 acides aminés appartenant à SEQ ID NO :5.

20. Fragment selon la revendication 17 ou 18, caractérisé en ce qu'il comprend ou consiste en
15 SEQ ID NO :6.

21. Fragment selon la revendication 17 ou 19, caractérisé en ce qu'il comprend ou consiste en une séquence peptidique ayant de 6 à 10 acides aminés ou de 8 à 12 acides aminés, lesdits acides aminés appartenant à
20 SEQ ID NO :5.

22. Cassette d'expression fonctionnelle dans une cellule issue d'un organisme procaryote ou eucaryote, permettant l'expression d'une séquence d'acide nucléique selon la revendication 5, ou d'un fragment selon l'une
25 quelconque des revendications 6 à 12, ou d'une molécule d'ADN selon la revendications 14, placée sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression.

23. Vecteur comprenant une cassette d'expression selon la revendication 22.

24. Cellule issue d'un organisme eucaryote ou
30 procaryote comprenant une cassette d'expression selon la revendication 22 ou un vecteur d'expression selon la revendication 23.

25. Cellule selon la revendication 24, caractérisée
35 en ce qu'elle est issue d'un organisme eucaryote choisi parmi les cellules COS et CHO.

26. Cellule selon la revendication 24, caractérisée en ce qu'elle est issue d'un organisme eucaryote inférieur choisi parmi les cellules de *Saccharomyces cerevisiae* et de *Pichia pastoris*.

5 27. Polypeptide susceptible d'être produit par une cassette d'expression selon la revendication 22, un vecteur selon la revendication 23, ou une cellule selon l'une quelconque des revendications 24 à 26.

10 28. Procédé pour préparer un polypeptide selon la revendication 16 ou un fragment polypeptidique selon l'une quelconque des revendications 17 à 20, selon lequel on cultive une cellule hôte telle que définie à l'une quelconque des revendications 24 à 26 dans un milieu de culture approprié, et on purifie ledit polypeptide produit
15 jusqu'à un degré de pureté requis.

29. Polypeptide immunogène consistant en un polypeptide tel que défini à la revendication 16 ou 27, ou en un fragment peptidique tel que défini à l'une quelconque des revendications 17 à 20.

20 30. Polypeptide selon la revendication 29, caractérisé en ce qu'il consiste en SEQ ID NO :6.

31. Anticorps monoclonal ou polyclonal susceptible d'être obtenu par immunisation d'un animal mammifère avec un peptide immunogène tel que défini dans la revendication
25 29 ou 30.

32. Composition diagnostique, caractérisée en ce qu'elle comprend un polypeptide tel que défini à la revendication 16 ou 27, ou un fragment polypeptidique tel que défini dans l'une quelconque des revendications 17 à
30 20, 29 et 30.

33. Composition diagnostique, caractérisée en ce qu'elle comprend un anticorps monoclonal ou un anticorps polyclonal tel que défini dans la revendication 31.

34. Procédé pour détecter des anticorps dirigés
35 contre le virus HXHV selon la revendication 1 ou au moins contre un polypeptide tel que défini à la revendication

16 ou 27, ou un fragment polypeptidique tel que défini dans l'une quelconque des revendications 17 à 20, selon lequel on met en contact un échantillon biologique suspecté être ou pouvoir avoir été infecté par le virus HXHV avec une composition diagnostique telle que définie dans la revendication 32, dans des conditions prédéterminées qui permettent la formation de complexe anticorps/antigène et on détecte la formation desdits complexes.

35. Procédé pour détecter un polypeptide tel que défini à la revendication 16 ou 27, ou un fragment polypeptidique tel que défini dans l'une quelconque des revendications 17 à 20, dans un échantillon biologique selon lequel on met en contact l'échantillon biologique avec une composition diagnostique telle que définie dans la revendication 32, dans des conditions prédéterminées qui permettent la formation de complexe anticorps/antigène et on détecte la formation desdits complexes.

36. Composition immunogène ou vaccinale, caractérisée en ce qu'elle comprend un polypeptide tel que défini à la revendication 16 ou 27, ou un fragment polypeptidique tel que défini dans l'une quelconque des revendications 17 à 20, 29 ou 30, ou le virus HXHV tel que défini dans la revendication 1, associé à un véhicule et/ou adjuvant et/ou diluant approprié et/ou à un excipient pharmaceutiquement acceptable.

37. Sonde d'au moins 12 nucléotides, caractérisée en ce qu'elle est susceptible de s'hybrider à une séquence d'acide nucléique telle que définie dans la revendication 5, ou à un fragment nucléotidique tel que défini dans l'une quelconque des revendications 6 à 12, ou à une molécule d'ADN ou d'ARN telle que définie dans la revendication 14 ou 15, l'hybridation étant réalisée dans les conditions de stringence correspondant à une combinaison de la température et de la concentration

saline choisie approximativement entre 12 à 20°C sous le T_m ("melting temperature") du complexe sonde - séquence d'acide nucléique à détecter.

38. Amorce d'au moins 12 nucléotides, caractérisée en ce qu'elle est susceptible de s'hybrider à une séquence d'acide nucléique telle que définie dans la revendication 5, ou à un fragment nucléotidique tel que défini dans l'une quelconque des revendications 6 à 12, ou à une molécule d'ADN ou d'ARN telle que définie dans la revendication 14 ou 15 l'hybridation étant réalisée dans les conditions de stringence correspondant à une combinaison de la température et de la concentration saline choisie approximativement entre 12 à 20°C sous le T_m ("melting temperature") du complexe amorce - séquence d'acide nucléique à amplifier et/ou détecter.

39. Amorce susceptible de s'hybrider à une séquence d'acide nucléique telle que définie dans la revendication 5, ou à un fragment nucléotidique tel que défini dans l'une quelconque des revendications 6 à 12, ou à une molécule d'ADN telle que définie dans la revendication 14, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi l'une quelconque des séquences SEQ IDs NO : 19 à 22.

40. Anticorps anti-acide nucléique, caractérisé en ce qu'il est susceptible de se lier à une séquence d'acide nucléique telle que définie dans la revendication 5, ou à un fragment nucléotidique tel que défini dans l'une quelconque des revendications 6 à 12, ou à une molécule d'ADN ou d'ARN telle que définie dans la revendication 14 ou 15.

41. Composition diagnostique, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une sonde ou une amorce ou un anticorps anti-acide nucléique tel(le) que défini(e) dans les revendications 37, 38, 39 et 40.

42. Procédé de détection d'un ADN ou d'un ARN viral, dans un échantillon biologique, selon lequel on traite si nécessaire ledit échantillon pour en extraire l'ADN ou

l'ARN, on met en contact ledit échantillon avec au moins une sonde ou une amorce telle que définie dans la revendication 37, 38 ou 39, dans des conditions de stringence déterminées, et on détecte la présence d'ADN ou d'ARN viral dans l'échantillon soit par mise en évidence d'une hybridation dudit ADN ou ARN viral avec au moins une sonde, soit par amplification dudit ADN ou ARN.

43. Procédé de diagnostic d'ADN et/ou d'ARN viral, selon lequel on prélève un échantillon de sérum ou de plasma d'un patient, on traite si nécessaire ledit échantillon pour en extraire l'ADN et/ou l'ARN, on met en contact ledit échantillon avec au moins un anticorps anti-acide nucléique tel que défini dans la revendication 31, ledit anticorps étant éventuellement marqué par tout marqueur approprié et on met en évidence la formation d'un complexe acide nucléique/anticorps.

44. Composition vaccinale comprenant une séquence d'ADN codant pour au moins un polypeptide ou un fragment polypeptidique tel que défini dans l'une quelconque des revendications 16 à 20, 29 et 30, ledit ADN étant mélangé avec un véhicule et/ou un diluant approprié.

45. Vecteur comprenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique ou vaccinal, ledit gène codant notamment

(i) soit au moins pour un polypeptide ou un fragment polypeptidique tel que défini dans l'une quelconque des revendications 16 à 20, 29 et 30;

(ii) soit au moins pour tout ou partie d'un anticorps polyclonal ou monoclonal capable de se fixer à au moins un polypeptide ou fragment polypeptidique défini en (i) ;

(iii) soit au moins pour une molécule inhibitrice d'au moins un polypeptide ou fragment polypeptidique défini en (i) ;

(iv) soit au moins pour un ligand ou toute partie d'un ligand capable de se fixer à au moins un polypeptide ou fragment polypeptidique défini en (i) et/ou d'inhiber sa fonction.

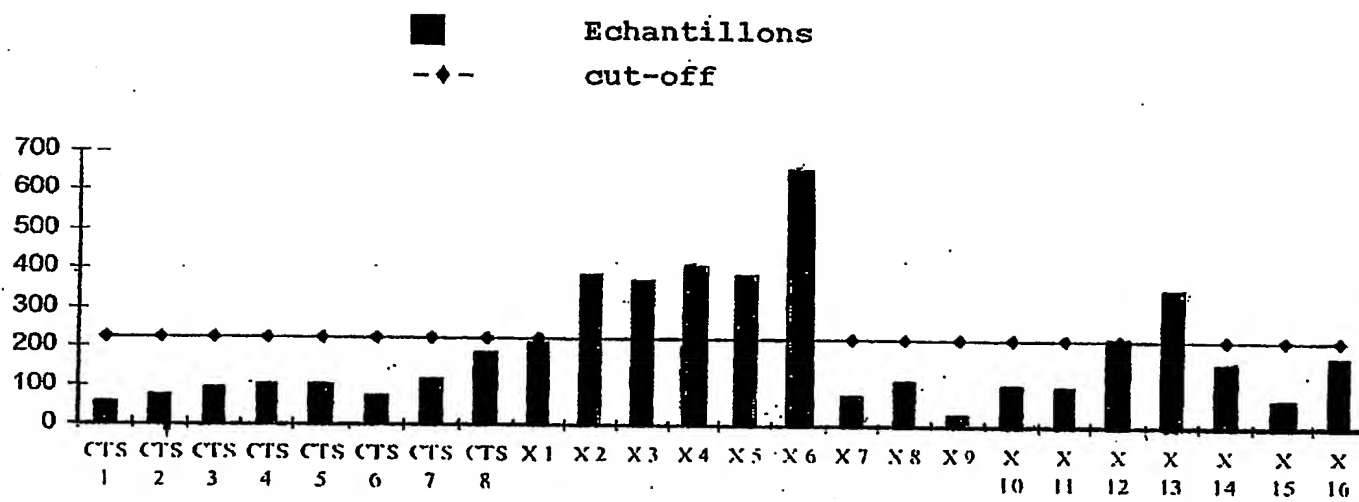
46. Composition thérapeutique ou vaccinale, caractérisée en ce qu'elle comprend, entre autre, un vecteur tel que défini dans la revendication 45 et en ce que ledit gène d'intérêt est placé sous la dépendance
5 d'éléments assurant son expression *in vivo*.

47. Cellule génétiquement modifiée, en particulier choisie parmi les cellules d'eucaryotes, telles que les cellules COS et CHO et les cellules d'eucaryotes inférieurs, telles que les cellules de levure, en
10 particulier les cellules issues de *Saccharomyces cerevisiae* et de *Pichia pastoris*, transformées par au moins une séquence d'acide nucléique selon la revendication 5 ou un fragment nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 6 à 12 ou une molécule d'ADN selon la
15 revendication 14 ou par un vecteur selon la revendication 45.

48. Composition pharmaceutique ou vaccinale, caractérisée en ce qu'elle comprend une cellule telle que définie dans la revendication 47.
20

FIGURE

ELISA 1/50



LISTE DE SEQUENCES

<110> BIOMERIEUX

INSERM

<120> Virus HXHV, matériel nucléique, matériel peptidique et utilisations

<130> HXHV

<140>

<141>

<150> FR0117048

<151> 2001-12-28

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1362

<212> ADN

<213> virus HXHV

<400> 1

```

actaccaaca gatcctcgac gaactgcgcc aggaactggc cgagcactac ctgctgcgca 60
gcgacctggc gatccaggat atcgccctgct acctcggttt caccgagtca cgctcgttcc 120
accgcagttt caagagctgg accgggcaga cgccgggcga gtttcgcgag agccggcgcc 180
gggataatcc gctgggctag cgcgatatgg ccggaacgc cgtgccagcc agtagtcgag 240
actcaaccat cgccccgccc cgctgatgaa aagcgccacg agcgagcca cggccggcac 300
cgggtgaggtt tgccaatggc atatcagtcc tcccggcgcc cttactcgtt cttatcgcca 360
ctgcacgtgc cttcaatacg ggagccttcc tgcgccttct cggcagcggc caggctgtag 420
ccgccggcca gttcctgctc agcgaagggg atgctagtgg cgtgggcagt gaacgccatg 480
taactcggca gtgcagcgcc ctagggtctg ttgccgtttc gcgcacggcc gcgtcgaaac 540
ggcaacagac cctagggtggc agtcagggtta ttggcatctc tccatcggtt tcgaatacgg 600
cgccaggttg gcgcctcgc agcaatggac gaggcaggga tgcgggcgtt acagcgggcg 660
aaaaagattt ctgtagccc gatgaaatac gggggcgctt tgctcgccag caatcgcgcc 720
tacgactgca tggacgcagg aggtagagcg aagcaggatg vvagagcaga aagctctctc 780
ccacagacac agaaacatcc accgcacggt aggaggtgat tcaaatagat aggcattctc 840
tctggttgga ctgcatggcc gctgcgagca cgggcgttgt ggttctgttg ctggccccc 900
tggttgagcg gctggtatgc cctgcccgcc gagctgctga gcttcatcgg cgcatcaat 960
atcgccctacg cctgcttttc catttcgctg gcgattcgcc tgcgacgcgc cgaagcgcta 1020
atcaagctgc tggcagtggc caacggactc tgggcgttgg catgccttgg catcgctacg 1080
atctttgccc cgctcatgac gctaccgggg ctttgtcatg tgctcggcga ggctgcatcc 1140
gtcgcaggcc tgggcatgct ggagtggaaa tggcgaggc agctgctggt ggctggcgaa 1200
cagggcgctt cgactcagct tgtcgcggtc cagtaaccgt cacaggattt caggcgaaga 1260
tccggcgatg gctgttcagg ccacatcag ccctatcctt cagccctgtg aaagcggttc 1320
ttgcccgctg gcttggccgc gtacctcgcc cccgaccacg ct 1362

```

<210> 2

<211> 101

<212> PRT

<213> virus HXHV

<400> 2

```

Thr Thr Asn Arg Ser Ser Thr Asn Cys Ala Arg Asn Trp Pro Ser Thr
  1                               5                               10                               15

```

```

Thr Cys Cys Ala Ala Thr Trp Arg Ser Arg Ile Ser Pro Ala Thr Ser

```

20 25 30
 Val Ser Pro Ser His Ala Arg Ser Thr Ala Val Ser Arg Ala Gly Pro
 35 40 45
 Gly Arg Arg Arg Ala Ser Phe Ala Arg Ala Gly Ala Gly Ile Ile Arg
 50 55 60
 Trp Ala Ser Ala Ile Trp Pro Glu Thr Pro Cys Gln Pro Val Val Glu
 65 70 75 80
 Thr Gln Pro Ser Pro Arg Pro Ala Asp Glu Lys Arg His Glu Arg Ser
 85 90 95
 His Gly Arg His Arg
 100

<210> 3
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> virus HXHV

<400> 3
 Ser Gly Ile Ser Ser Gly Trp Thr Ala Trp Pro Leu Arg Ala Arg Ala
 1 5 10 15
 Leu Trp Phe Cys Cys Trp Pro Pro Trp Leu Ser Gly Trp Tyr Ala Leu
 20 25 30
 Pro Gly Glu Leu Leu Ser Phe Ile Gly Ala Ile Asn Ile Ala Tyr Ala
 35 40 45
 Cys Phe Ser Ile Ser Leu Ala Ile Arg Leu Arg Arg Ala Glu Ala Leu
 50 55 60
 Ile Lys Leu Leu Ala Val Ala Asn Gly Leu Trp Ala Leu Ala Cys Leu
 65 70 75 80
 Gly Ile Ala Thr Ile Phe Ala Pro Leu Met Thr Leu Pro Gly Leu Cys
 85 90 95
 His Val Leu Gly Glu Ala Ala Ser Val Ala Gly Leu Gly Met Leu Glu
 100 105 110
 Trp Lys Trp Arg Arg Gln Leu Leu Val Ala Gly Glu Gln Gly Val Ser
 115 120 125
 Thr Gln Leu Val Ala Val Gln
 130 135

<210> 4
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> virus HXHV

<400> 4
 Lys Ala Pro Arg Ala Gln Pro Arg Pro Ala Pro Val Arg Phe Ala Asn
 1 5 10 15

Gly Ile Ser Val Leu Pro Ala Pro Leu Leu Val Leu Ile Ala Thr Ala
 20 25 30
 Arg Ala Phe Asn Thr Gly Ala Phe Leu Arg Leu Leu Gly Ser Gly Gln
 35 40 45
 Ala Val Ala Ala Gly Gln Phe Leu Leu Ser Glu Gly Asp Ala Ser Gly
 50 55 60
 Val Gly Ser Glu Arg His Val Thr Arg Gln Cys Ser Ala Leu Gly Ser
 65 70 75 80
 Val Ala Val Ser Arg Thr Ala Ala Ser Lys Arg Gln Gln Thr Leu Gly
 85 90 95
 Gly Ser Gln Gly Ile Gly Ile Ser Pro Ser Val Ser Asn Thr Ala Pro
 100 105 110
 Gly Trp Arg Pro Arg Ser Asn Gly Arg Gly Arg Asp Ala Gly Val Thr
 115 120 125
 Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser
 130 135

<210> 5
 <211> 183
 <212> PRT
 <213> virus HXHV

<400> 5
 Glu Val Ile Gln Met Ile Arg His Leu Leu Trp Leu Asp Cys Met Ala
 1 5 10 15
 Ala Ala Ser Thr Gly Val Val Val Leu Leu Leu Ala Pro Leu Val Glu
 20 25 30
 Arg Leu Val Cys Pro Ala Arg Arg Ala Ala Glu Leu His Arg Arg Asp
 35 40 45
 Gln Tyr Arg Leu Arg Leu Leu Phe His Phe Ala Gly Asp Ser Pro Ala
 50 55 60
 Thr Arg Arg Ser Ala Asn Gln Ala Ala Gly Ser Gly Gln Arg Thr Leu
 65 70 75 80
 Gly Val Gly Met Pro Trp His Arg Tyr Asp Leu Cys Pro Ala His Asp
 85 90 95
 Ala Thr Gly Ala Leu Ser Cys Ala Arg Arg Gly Cys Ile Arg Arg Arg
 100 105 110
 Pro Gly His Ala Gly Val Glu Met Ala Gln Ala Ala Ala Gly Gly Trp
 115 120 125
 Arg Thr Gly Arg Phe Asp Ser Ala Cys Arg Gly Pro Val Thr Val Thr
 130 135 140
 Gly Ile Gln Ala Lys Ile Arg Arg Trp Leu Phe Arg Pro Ser Ser Ala
 145 150 155 160

Leu Ser Phe Ser Pro Val Lys Ala Val Leu Ala Arg Val Leu Gly Arg
165 170 175

Val Pro Arg Pro Arg Pro Arg
180

```
<210> 6
<211> 14
<212> PRT
<213> virus HXHV
```

<400> 6
Arg Arg Ala Ala Glu Leu His Arg Arg Asp Gln Tyr Arg Leu
1 5 10

```
<210> 7
<211> 16
<212> ADN
<213> Séquence artificielle
```

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: amorce
6B1

<400> 7
taccaacaga tcctcg

16

```
<210> 8
<211> 16
<212> ADN
<213> Séquence artificielle
```

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: amorce
6B.A

<400> 8
atatcgacctg ctacct

16

```
<210> 9
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle
```

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: amorce
S6M13

```
<400> 9
gccatgtaac tcggcagtgc
```

20

<210>	10
<211>	20
<212>	ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce
1M13

<400> 10
cccgccccgc tgatgaaaag 20

<210> 11
<211> 15
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce 6B
antisens

<400> 11
tatgccattg gcaaa 15

<210> 12
<211> 18
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce
6B.B

<400> 12
atgggttgagt ctcgacta 18

<210> 13
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce
3T7

<400> 13
atgccaacgc ccagagtccg 20

<210> 14
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce
1T7

<400> 14
gatgtttctg tgtctgtggg 20

<210> 15
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: amorce
Comp S6M13

<400> 15
gcactgccga gttacatggc 20

<210> 16
<211> 36
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: sonde 6B

<400> 16
tccgctgggc tagcgcgata tggccgaaa cgccgt 36

<210> 17
<211> 40
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: sonde PAS

<400> 17
atggacgagg cagggatgcg ggcgttacag cgggcgaaaa 40

<210> 18
<211> 30
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: sonde T7

<400> 18
ccttcctgcg ccttctcggc agcggtcagg 30

<210> 19
<211> 18
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: amorce S1

<400> 19
gcgttggtggttctgttc 18

<210> 20

<211> 18
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce S2

<400> 20

gatcaatatcgctacgc

18

<210> 21
<211> 19
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce AS1

<400> 21

ctgaaggatagggtgatg

19

<210> 22
<211> 18
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce AS2

<400> 22

ctgttcgccagccaccag

18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 02/04578

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 C12N7/00 C07K14/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DENIS F ET AL: "LES NOUVEAUX VIRUS DES HEPATITES E, GB ET SUIVANTS. NEW HEPATITIS VIRUSES E, GB AND NEXT" TRANSFUSION CLINIQUE ET BIOLOGIQUE, ARNETTE-BLACKWELL, PARIS, FR, vol. 3, no. 1, 1996, pages 19-25, XP000612674 ISSN: 1246-7820 the whole document	1
A	BOWDEN D S ET AL: "NEW HEPATITIS VIRUSES: ARE THERE ENOUGH LETTERS IN THE ALPHABET?" MEDICAL JOURNAL OF AUSTRALIA, XX, XX, vol. 164, no. 2, 1996, pages 87-89, XP000612664 the whole document	1

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the International filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

23 April 2003

Date of mailing of the International search report

09/05/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Panzica, G

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dernière Internationale No
PCT/FR 02/04578

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12N7/00 C07K14/18

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C12N C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)
WPI Data, PAJ, EPO-Internal, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	DENIS F ET AL: "LES NOUVEAUX VIRUS DES HEPATITES E, GB ET SUIVANTS. NEW HEPATITIS VIRUSES E, GB AND NEXT" TRANSFUSION CLINIQUE ET BIOLOGIQUE, ARNETTE-BLACKWELL, PARIS, FR, vol. 3, no. 1, 1996, pages 19-25, XP000612674 ISSN: 1246-7820 le document en entier	1
A	BOWDEN D S ET AL: "NEW HEPATITIS VIRUSES: ARE THERE ENOUGH LETTERS IN THE ALPHABET?" MEDICAL JOURNAL OF AUSTRALIA, XX, XX, vol. 164, no. 2, 1996, pages 87-89, XP000612664 le document en entier	1

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

23 avril 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

09/05/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Panzica, G

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)